

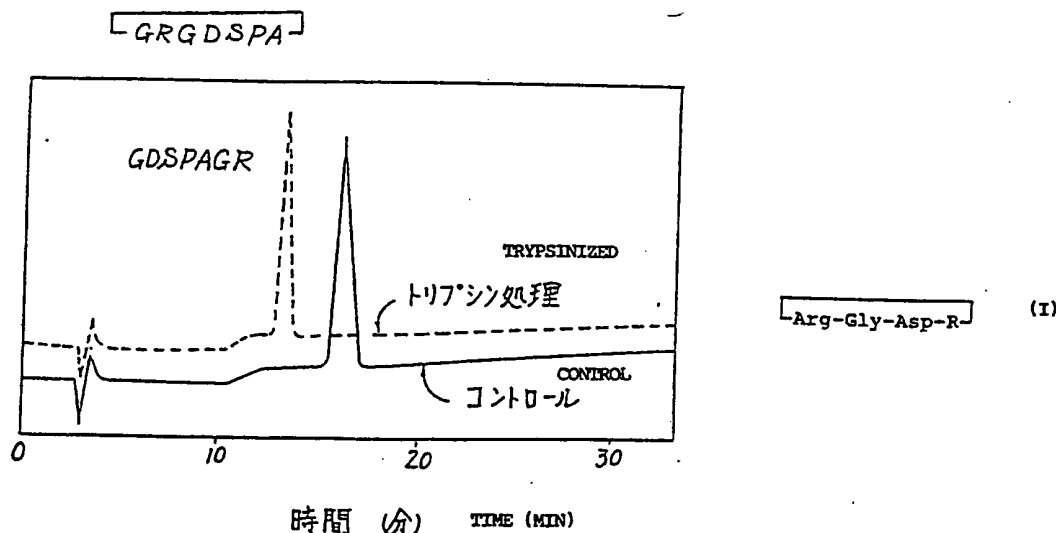


## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 <sup>4</sup> C07K 5/12, 7/64, A61K 37/02 C12N 5/00		A1	(11) 国際公開番号 WO 90/02751
			(43) 国際公開日 1990年3月22日 (22.03.90)
(21) 国際出願番号 PCT/JP89/00926 (22) 国際出願日 1989年9月8日 (08. 09. 89) (30) 優先権データ 特願昭63-224552 1988年9月9日 (09. 09. 88) JP 特願平1-56350 1989年3月10日 (10. 03. 89) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 旭硝子株式会社 (ASAHI GLASS COMPANY LTD.) (JP/JP) 〒100 東京都千代田区丸の内二丁目1番2号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 大場優孝 (OHBA, Masataka) (JP/JP) 〒230 神奈川県横浜市鶴見区北寺尾7-21-3 Kanagawa, (JP) 熊谷博道 (KUMAGAI, Hiromichi) (JP/JP) 〒150 東京都渋谷区渋谷1-19-15 Tokyo, (JP) 針江俊策 (HARIE, Shunsaku) (JP/JP) 〒235 神奈川県横浜市磯子区丸山1-33-3 Kanagawa, (JP) 内田啓一 (UCHIDA, Keiichi) (JP/JP) 〒213 神奈川県川崎市宮前区神木本町1-23-13 Kanagawa, (JP)		(74) 代理人 弁理士 山本量三, 外 (YAMAMOTO, Ryozo et al.) 〒101 東京都千代田区神田東松下町38番地 島本鎮栄ビル Tokyo, (JP) (81) 指定国 AT (欧州特許), BE (欧州特許), CH (欧州特許), DE (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), IT (欧州特許), LU (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US. 添付公開書類 国際調査報告書	

(54) Title: PEPTIDE DERIVATIVES AND THEIR USE

(54) 発明の名称 ペプチド誘導体およびその用途



## (57) Abstract

The invention provides peptide derivatives comprising synthetic cyclic peptides represented by formula (I), or salts thereof, wherein R represents an amino acid residue or an oligo- or polypeptide residue, and a pharmaceutical agent containing said derivative as an active ingredient and inhibiting adhesion of animal cells to a substrate. The peptide derivatives are stable to hydrolysis by enzymes, and the pharmaceutical agent is effective in inhibiting adhesion of animal cells to a substrate, depressing metastasis of cancer cells, and inhibiting agglutination of platelets.

(57) 要約

本発明は、下記式 [ I ] で表わされる合成環状ペプチド、またはその塩、からなるペプチド誘導体



ただし、R は、アミノ酸残基あるいはオリゴ～ポリペプチド残基

および、このペプチド誘導体を有効成分とする動物細胞の接着を阻害する薬剤である。

本発明のペプチド誘導体は酵素による加水分解に対して安定であり、本発明の薬剤は動物細胞の基質に対する接着阻害、ガン細胞の転移抑制、血小板の凝集阻害などに有効である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア	ES スペイン	MG マダガスカル
AU オーストラリア	FI フィンランド	ML マリ
BB バルバドス	FR フランス	MR モーリタニア
BE ベルギー	GA ガボン	MW マラウイ
BF ブルキナ・ファソ	GB イギリス	NL オランダ
BG ブルガリア	HU ハンガリー	NO ノルウェー
BJ ベナン	IT イタリア	RO ルーマニア
BR ブラジル	JP 日本	SD スーダン
CA カナダ	KP 朝鮮民主主義人民共和国	SE スウェーデン
CF 中央アフリカ共和国	KR 大韓民国	SN セネガル
CG コンゴ	LI リヒテンシュタイン	SU ソビエト連邦
CH スイス	LK スリランカ	TD チャード
CM カメルーン	LU ルクセンブルグ	TG トーゴ
DE ドイツ	MC モナコ	US 米国
DK デンマーク		

## 明 細 書

## ペプチド誘導体およびその用途

## 〔技術分野〕

本発明は新規な合成環状ペプチドあるいはその塩からなるペプチド誘導体、およびそれを有効成分とする動物細胞の接着阻害剤に関するものである。

## 〔背景の技術〕

動物細胞の細胞外基質に対する接着性に関与する因子として、フィブロネクチンやビトロネクチンが知られている。これらの細胞接着因子は -Arg-Gly-Asp- なる接着部位を有する。従って、この接着部位と同じトリペプチド残基を有する化合物は細胞接着因子による接着性を阻害する。即ち、この細胞接着阻害因子は細胞接着因子が結合する被接着部位に結合するためその後細胞接着因子が結合することを阻害する。このような細胞接着阻害因子としてはたとえば Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro が知られている。細胞接着阻害因子は動物細胞の接着性に関連する研究用の試薬として用いられている他、癌細胞

の転移の抑制（転移先での接着固定化の阻止）  
のための薬剤として期待されている。

従来公知の細胞接着阻害因子は線状ペプチドであるため溶液中で特定の立体構造が安定的に存在し難くその効果を十分に発揮し難い場合があった。また、アミノ末端やカルボキシル末端が存在しているためアミノペプチターゼやカルボキシペプチターゼなどの酵素による加水分解を受け易く、これら酵素の存在する液中での安定性が不充分であった。

細胞接着阻害因子の構造安定性を向上すべく、前記トリペプチド残基の他にシステイン残基を有するポリペプチドを合成し、ジスルフィド結合で環化した化合物が知られている（M.D. Pierschbadhen 他、J.Biol.Chem., 262, 17294-17298 (1987)）。しかしながら、ジスルフィド結合を有する細胞接着阻害因子も上記問題を十分に解決するまでには至っていない。

#### [ 発明の開示 ]

本発明は、前記課題を解決した新規なペプチド誘導体、およびそれを有効成分とする細胞接着阻害活性を有する薬剤に関する下記発明である。

下記式 [ I ] で表わされる合成環状ペプチド、またはその塩、からなるペプチド誘導体。



ただし、R は、アミノ酸残基あるいはオリゴ～ポリペプチド残基

下記式 [ I ] で表わされる合成環状ペプチドまたはその塩からなるペプチド誘導体を有効成分とする動物細胞の接着を阻害する薬剤。



ただし、R は、アミノ酸残基あるいはオリゴ～ポリペプチド残基

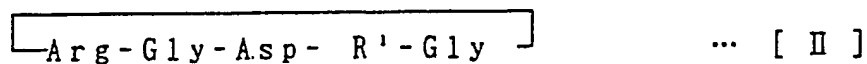
本発明において、アミノ酸とは  $\alpha$ -アミノ酸は勿論他のアミノ酸 ( $\beta$ -アミノ酸、 $\gamma$ -アミノ酸など) をも意味する。 $\alpha$ -アミノ酸以外のアミノ酸としては、 $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$  ( $m$  は 2 以上の整数) で表わされるアミノ酸が適当であり、たとえば、3-アミノプロピオン酸、4-アミノブタン酸、5-アミノペンタン酸、6-アミノカブロン酸、7-アミノペンタン酸、8-アミノカプリル酸などがある。好ましくは、 $m$  は 8 以下の整数である。また、 $\alpha$ -アミノ酸としては、L-アミノ酸は勿論、D-アミノ酸

や D, L-アミノ酸であってもよい。本発明における好ましいアミノ酸は  $\alpha$ -アミノ酸であり、特にその内の L-アミノ酸である（以下、特に言及しない限りアミノ酸はこの L-アミノ酸を意味する）。アミノ酸残基とはアミノ基の水素原子 1 個とカルボキシル基のヒドロキシ基を除いた残基をいう。

本発明において、R におけるオリゴ～ポリペプチドとは上記のようなアミノ酸が 2 以上ペプチド結合で連結したものをいう。好ましいアミノ酸残基数は 16 以下である。アミノ酸としては  $\alpha$ -アミノ酸が好ましい。特にオリゴ～ポリペプチドの全アミノ酸残基が  $\alpha$ -アミノ酸であることが好ましい。しかし、一部のアミノ酸残基は上記  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$  や  $\beta$ -アミノ酸などの  $\alpha$ -アミノ酸以外の残基あるいは D-アミノ酸残基であってもよい。オリゴ～ポリペプチドにおけるアミノ酸残基の数は、特に 2～11 が好ましい。オリゴ～ポリペプチド残基とはアミノ末端側のアミノ基の水素原子 1 個とカルボキシル末端側のカルボキシル基のヒドロキシ基を除いた残基をいう。

本発明における合成環状ペプチドは後述細胞

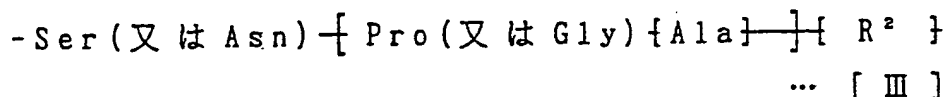
接着阻害効果を発揮するためには、-Arg-Gly-Asp-のペプチドブロックが必要である。しかし、このペプチドブロックのみの環状ペプチドでは効果の発揮が充分ではなく、それ以外に少なくとも1つのアミノ酸残基の存在が必要である。より好ましくは、このペプチドブロックの前後（アミノ末端側とカルボキシ末端側）に少なくとも1個の $\alpha$ -アミノ酸残基が存在することが好ましく、特にアミノ末端側にグリシン残基が存在すること（即ち、Rのカルボキシ末端がGlyであること）が好ましい。この合成環状ペプチドは下記式〔II〕で表わされる。



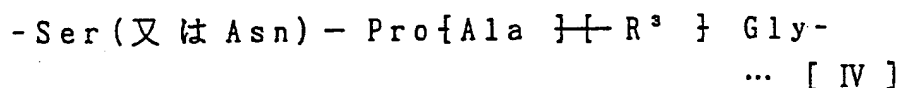
式〔II〕において、 $R^1$ はカルボキシ末端側がグリシン残基であるRのグリシン残基以外の部分を示す。好ましい $R^1$ はアミノ酸残基、あるいはアミノ酸残基数10以下のオリゴペプチド残基である。

また、前記必須の-Arg-Gly-Asp-のペプチドブロックのカルボキシル側はセリン残基またはアスパラギン残基であることが好ましい。それに続く2番目のアミノ酸残基はプロリン残基あ

るいはグリシン残基であることが好ましい。さらに、3番目のアミノ酸残基はアラニン残基であることが好ましい。従って、また好ましい R は次の式 [Ⅲ] で表わされるオリゴ～ポリペプチドである。



なお、式 [Ⅲ] 内の 3 個の [ ] は存在することが好ましい（場合によっては存在しなくてもよい）残基を示し、R<sup>2</sup>は R から式 [Ⅲ] で示した具体的アミノ酸残基を除いたオリゴ～ポリアミノ酸残基あるいはアミノ酸残基を示す。特に好ましい R は下記式 [Ⅳ] で表わされるオリゴ～ポリペプチド残基である。



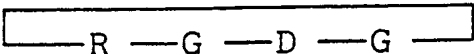
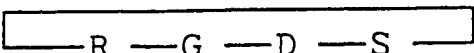
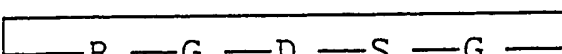
式 [Ⅳ] において 2 個の [ ] は存在することが好ましい（場合によっては存在しなくともよい）残基を示す。R<sup>3</sup>としてはアミノ酸残基、あるいはアミノ酸残基数 2～7 のオリゴペプチド残基であることが好ましい。R<sup>3</sup>のあるいは R<sup>3</sup>中のアミノ酸残基の種類には制約が少なく、その一部は前記したように D-アミノ酸残基や α-



アミノ酸以外のアミノ酸の残基であってもよい。

式 [ I ] で表わされる環状ペプチドは R のカルボキシル末端とアルギニンのアミノ末端とがペプチド結合で連結したものである。ただし、式 [ I ] で表わされる環状ペプチドはその合成経路を示すものではない。即ち、この環状ペプチドは Arg-Gly-Asp-R を合成した後にそれを環化する方法は勿論、他の任意の位置のペプチド結合部分を形成することによって環化する方法で合成できるものである。たとえば、Arg-Gly-, Gly-Asp あるいは Asp-R 間のペプチド結合は勿論 R 内の任意のペプチド結合部分を形成して環化することができる。以下に本発明環状ペプチドを具体的に例示するが、これらに限られるものではない。

なお、下記の環状ペプチドにおける  $\alpha$ -アミノ酸残基は、一文字記号で表示する。

1. 
2. 
3. 

4.  R — G — D — S — P
5.  R — G — D — S — P — G
6.  R — G — D — S — P — A
7.  R — G — D — S — P — A — G
8.  R — G — D — S — P — A — T — G
9.  R — G — D — S — P — A — V — T — G
10.  R — G — D — S — P — A — A — V — T — G
11.  R — G — D — V
12.  R — G — D — D
13.  R — G — D — A
14.  R — G — D — I
15.  R — G — D — P
16.  R — G — D — L
17.  R — G — D — K
18.  R — G — D — N
19.  R — G — D — T

20. —R —G —D —N —G —21. —R —G —D —V —T —22. —R —G —D —N —P —G —23. —R —G —D —A —D —24. —R —G —D —N —P —A —G —25. —R —G —D —P —D —26. —R —G —D —K —I —

上記ペプチドの塩としては、酢酸、酒石酸、クエン酸、トリフルオロ酢酸、メタンスルホン酸、塩酸、硫酸、硝酸、リン酸などとの有機酸塩または無機酸塩類あるいはナトリウム、カリウムなどのアルカリ金属塩類カルシウム塩等のアルカリ土類金属塩類、アンモニウム、エタノールアミン、トリエチルアミン、ジシクロヘキシルアミンなどの有機アミン類などの様な無機塩基、有機塩基との塩類を意味する。

本発明の環状ペプチドは通常のパプチド合成法によって合成できる。前記のように、環化は線状のパプチド合成後に環化反応で行なわれる

が、その環化を行う部分は隣接アミノ酸残基間の任意のペプチド結合を形成することによって行うことができる。

本発明の上記合成環状ペプチドは動物細胞の接着を阻害するための薬剤として有効である。動物細胞としては哺乳動物細胞が好ましく、さらに通常の体細胞や生殖細胞は勿論、癌細胞などがある。また、血小板などの無核細胞の接着阻害にも有効である。特に対象となる動物細胞は各種癌細胞である。癌の転移は癌細胞の他の細胞や細胞外基質に対する接着が関与している。従って、癌細胞の接着を阻害することは癌の転移防止に有効であると考えられる。また、血小板の血管内壁への付着を阻害することができれば血栓などの発生を防止することが可能となると考えられる。本発明の合成環状ペプチドは後述実施例に示すように動物細胞の接着阻害効果が優れているばかりでなく、酸素による加水分解を受け難く生体内安定性に優れている。しかも、たとえ加水分解を受けたとしても前記必須のペプチドブロック部分やその近傍が加水分解を受けない限り加水分解により生じる線状ペプチドもまたある程度の細胞接着阻害効果を

有する。

[ 図面の簡単な説明 ]

第 1 図は、実施例 1 で合成した環状ペプチド（コントロール実線）およびそれをトリプシンで 24 時間処理したもの（破線）の高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）分析結果を示すグラフである。第 2 図は、比較のための線状ペプチドの同じく HPLC 分析結果を示すグラフである。第 3 図は実施例 1 C の細胞接着阻害試験の結果（フィブロネクチンコートの場合）を示すグラフであり、第 4 図は同じくビトロネクチンコートの場合の試験結果を示すグラフである。第 5 図は実施例 2 で合成した環状ペプチドの分解試験結果を示す HPLC 分析結果のグラフである。第 6 図は比較のための線状ペプチドの同じく HPLC 分析結果を示すグラフである。第 7 図は実施例 2 で合成した環状ペプチドの細胞接着阻害試験の結果を示すグラフである。

[ 発明を実施するための最良の形態 ]

以下、本発明を実施例によって具体的に説明するが、本発明はこの実施例に限られるものではない。

なお、以下の実施例においては、アミノ酸、

保護基、活性基などについてIUPAC-IUB Commission on Biological Nomenclatureに基づく略号および当該分野における慣用略号で表示する場合があります、それらを例示すると下記の通りである。

Ala:アラニン

Asn:アスパラギン

Asp:アスパラギン酸

Arg:アルギニン

Gly:グリシン

Thr:スレオニン

Ile:イソロイシン

Leu:ロイシン

Lys:リジン

Pro:プロリン

Val:バリン

Ser:セリン

Boc:t-ブドキシカルボニル

OBzl:ベンジルエステル

HOBT:p-ヒドロキシベンゾトリアゾール

OSu:N-ヒドロキシスクイシニンイミドエステル

OPac:フェナシルエステル

WSC·HCl:1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロ

ビル) カルボジイミド塩酸塩

TFA: トリフルオロ酢酸

OPFP: ペンタフルオロフェニルエステル

DCC: ジシクロヘキシルカルボジイミド

DC urea: シクロヘキシルウレア

OcHex: シクロヘキシルエステル

Tos: p-トルエンスルホンニル基

### 実施例 1

A. 環状ペプチド ( R G D S P A G ) の  
合成

#### (1) BocAla OPacの合成

BocAla 9.5g (50mmol) をメタノール 100ml に溶解したのち 25% (W/V)  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  水溶液を 33ml 加えた。これを減圧濃縮したのち、トルエン 30ml を加え再び減圧下で乾固した。この操作を 3 回行なって水分を除いてから、DMF を 150ml 加えて固型分を溶解し、そこへフェナシルブロミド 10g (50mmol) を加え、室温にて 1 時間攪はんした。沈殿物 ( $\text{CsBr}$ ) を濾過して除いたのち減圧下で DMF を留去してから酢酸エチル 200ml を加えて水 200ml、1 N 塩酸 200ml (2回) 水 200ml、5% 炭酸水素ナトリウム水溶液 200ml (2回)、水

200ml の順で酢酸エチル層を洗浄した。無水硫酸ナトリウムを加えて乾燥してから減圧乾固すると白色結晶 13.4g (143.6mmol, 収率 87.2%) を得た。

(2) H<sub>2</sub>N Ala OPac TFA の合成

Boc Ala OPac 13g (42.3mmol) を 300ml ナスフラスコに入れ、トリフルオロ酢酸 (TFA) 70ml を加え室温で 20 分攪拌したのち減圧濃縮した。ここへエーテル 300ml を加えると白色結晶が析出したので濾過し、エーテルでよく洗浄したのち乾燥したところ H<sub>2</sub>N Ala OPac·TFA 13.2g (41.1mmol, 収率 97.1%) を得た。

(3) Boc Pro Ala OPac の合成

BocPro 6.45g (30mmol)、NH<sub>2</sub>AlaOPac·TFA 9.21g (30mmol) を DMF 60ml に溶解し、氷冷下 N-メチルモルホリンで pH6 にした。ここへ HOBt 4.6g、WSC·HCl 5.8g を加え再び N-メチルモルホリンで pH6 にして、終夜攪拌した。減圧下で DMF を留去したのち酢酸エチル 100ml を加え、水 100ml、1N HCl 100ml (2回)、水 100ml 水 5% 炭酸水素ナトリウム水溶液 100ml (2回)、水 100ml の順に酢酸エチル層を洗浄し、無水硫酸ナトリウムを加え乾燥した。減圧濃縮してからヘキサンを加えた



ところ、白色結晶が析出したので濾取しこれを酢酸エチル-ヘキサンから再結晶し、Boc Pro Ala OPac 6.5g(16.1mmol、収率54%)を得た。

アミノ酸分析値 Ala 1.0 Pro 0.96

(4) Boc Ser(Bzl)·Pro Ala OPacの合成

Boc Pro Ala OPac 6.5g(16mmol) を30ml TFAに加えて、30分間室温で攪拌したのち、減圧下でTFAを留去しオイルを得た。このオイルをエーテル200mlで3回洗ったのち、減圧下でエーテルを除いた。そこへDMF 40mlを加え氷冷してN-メチルモルホリンでpH6に合わせた。Boc Ser(Bzl) 4.72g(16mmol)、HOBt 2.4g、WSC·HCl 3.1gの順に加え、再びN-メチルモルホリンでpH6に合わせて、終夜攪拌した。減圧下でDMFを除いたのち、酢酸エチル100mlに溶解し、酢酸エチル層を水100ml、1NHCl 100ml(2回)、水100ml、5%炭酸水素ナトリウム水溶液100ml(2回)水100mlの順で洗浄し、無水硫酸ナトリウムを加えて乾燥した。減圧下で酢酸エチルを留去して白色粉末7.88g(13.5mmol、収率84.4%)を得た。

アミノ酸分析 : Ser 0.90 Pro 0.94 Ala 1.0

(5) Boc Asp(OBzl)Ser(Bzl)Pro Ala OPacの合成

Boc Ser(Bzl)Pro Ala OPac 7.5g(13mmol) を 30mlTFA に加えて室温にて30分間攪拌したのち、減圧下でTFAを留去してオイル7.66gを得た。このオイルにエーテルを加えよく洗いエーテルをデカンテーションして除く操作を3回行ない、減圧下でエーテルを除いたのち、DMF 30mlに溶解し氷冷した。そこへBoc Asp(OBzl) 4.2g(13mmol)HOBt 2g WSC·HCl 3gを加えN-メチルモルホリンでpH6にして終夜攪拌した。減圧下でDMFを留去して得たオイルを酢酸エチル 100ml に溶解し、その酢酸エチル層を水 100ml、1NHCl 100ml (2回)、水 100ml、5%炭酸水素ナトリウム水溶液 100ml (2回)、水 100ml の順に洗浄し、無水硫酸ナトリウムを加えて乾燥した。減圧下で酢酸エチルを除き得られた粉末を酢酸エチル／エーテル／ヘキサンから再結晶したところ白色粉末 8.86g(11.3mmol, 収率 86.9%)を得た。

アミノ酸分析 : Asp 1.02    Ser 0.84    Pro 0.97  
                         Ala 1.0

(6) Boc Arg(Tos)Gly OBzl の合成

Boc Arg(Tos)11.3g(26.3mmol) を THF 50ml に溶解し氷冷した。そこへ Gly OBzl·Tos OH 8.9g

(26.4mmol)、HOBt 4.0g WSC·HCl 5.1g を加え、トリエチルアミンで pH6 に合わせ、終夜攪拌した。減圧下で THF を留去して得たオイルを酢酸エチル 100ml に溶解し、その酢酸エチル層を水 100ml、1N HCl 100ml (2回)、水 100ml に溶解し、その酢酸エチル層を水 100ml、1N HCl 100ml (2回)、水 100ml 5%炭酸水素ナトリウム水溶液 100ml (2回)、水 100ml 5% 炭酸水素ナトリウム水溶液 100ml (2回)、水 100ml の順で洗浄し、無水硫酸ナトリウムを加えて乾燥した。減圧下で酢酸エチルを留去したのち、ヘキサンを加えて白色沈殿 13.3g (22.5mmol、収率 85.5%)を得た。

アミノ酸分析 Ala 0.99 Gly 1.0

(7) Boc Gly Arg(Tos)Gly OBzl の合成

Boc Arg (Tos)Gly OBzl 13g (22mmol) に TFA 80ml を加え室温で 1.5 分間攪拌したのち減圧下で TFA を留去したのち、エーテルを加え沈殿をよく洗浄した。減圧下でエーテルを除いたのち THF 100ml に溶解し、氷冷下 Boc Gly 3.85g (22mmol)、HOBt 3.4g WSC·HCl 4.22g を加えトリエチルアミンで pH6 に合わせて、終夜攪拌した。減圧下で THF を留去して得たオイルを酢酸

エチル 100ml に溶解し、酢酸エチル層を水 100 ml、1N HCl 100ml (2 回)、水 100ml、5%炭酸水素ナトリウム水溶液 100ml (2 回)、水 100ml の順で洗浄し、無水硫酸ナトリウムを加えて乾燥した。減圧下で酢酸エチルを留去して白色粉末 13.5g (21.3mmol、収率 96.8%)を得た。

アミノ酸分析 Ala 0.99 Gly 2.0

(8) Boc Gly Arg(Tos)Gly OH の合成

Boc Gly Arg(Tos)Gly OBzl 13.5g (21.3mmol) をメタノール 100ml に溶解し酢酸 50ml、水 20 ml、5%パラジウム炭素を加え水素を3時間通じた。5%パラジウム炭素を濾過して除いて溶媒を減圧下で留去したのち酢酸エチル 100ml に溶解し硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過したのち、減圧下で酢酸エチルを留去して、白色粉末 9.76g (19.4mmol、91%)を得た。

(9) H<sub>2</sub>N Asp(OBzl)Ser(Bzl)Pro Ala OPac·TFA の合成

前記 (5) で合成した Boc Asp (OBzl)Ser(Bzl)Pro Ala OPac 8g (10mmol) に 50ml TFA を加え室温にて 30 分攪拌したのち、減圧下で TFA を留去した。エーテルを加え -20℃ に保温すると、白色結晶が析出したので上清をデカンテーション

で除き残査をメタノール／エーテルから再結晶した。7.9g(9.9mmol、収率99%)

(10) Boc Gly Arg(Tos)Gly Asp(OBzl)Ser(Bzl)  
Pro Ala OPacの合成

H<sub>2</sub>N Asp(OBzl)Ser(Bzl)Pro Ala OPac·TFA 1.5g(2mmol)をDMF 10mlに溶解し、そこへ前記(8)で合成したBoc Gly Arg(Tos)Gly OH 1.2g(2mmol)、HOBt 0.3g WSC·HCl 0.5gを加え、N-メチルモルホリンでpH6に合わせて終夜攪拌した。減圧下でDMFを留去して得たオイルを酢酸エチル50mlに溶解し、水50ml、1NHCl 50ml(2回)、水50ml、5%炭酸水素ナトリウム水溶液50ml(2回)、水50mlの順に洗浄したのち、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下で酢酸エチルを留去して得た白色粉末をエーテルでよく洗い乾燥して1.36g(1.06mmol、収率50%)を得た。

アミノ酸分析 Gly 2.0 Arg 0.97 Asp 0.98  
Ser 0.85 Pro 0.89 Ala 1.0

(11) Boc Gly Arg(Tos)Gly Asp(OBzl)Ser(Bzl)  
Pro Ala OHの合成

Boc Gly Arg(Tos)Gly Asp(OBzl)Ser(Bzl)Pro Ala OPac 1.0g(0.8mmol)を90%酢酸30mlに溶解し、そこへ亜鉛末3.3g(40mmol)を氷冷下に加え、

0℃で3時間攪拌した。濾過して亜鉛末を除いたのち、減圧下で溶媒を留去し残渣に1N HCl 30 mlを加え、酢酸エチル50 mlで抽出した。1N HCl 50 ml、水50 mlの順で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下で酢酸エチルを減圧濃縮したのちエーテルを加えて、白色粉末0.85 g (0.72 mmol, 90%)を得た。

(12) GlyArg(Tos)GlyAsp(OBzl)Ser(Bzl)ProAla

の合成

Boc Gly Arg(Tos)Gly Asp(OBzl)Ser(Bzl)ProAla OH 0.85 g (0.72 mmol)を5 ml DMFに溶解したのち、HOSu 0.15 g (1.3 mmol) WSC·HCl 0.25 gを加え、N-メチルモルホリンでpH6に合わせ終夜攪拌した。減圧下DMFを留去したのち水を加えて得たオイルをよく洗い分離して減圧下で乾燥した。そこへTFA 20 mlを加え室温で10分間攪拌したのち減圧下でTFAを留去した。エーテルを加えて析出した白色粉末を濾取した。0.79 g (0.61 mmol, 84%)これを5 ml DMFに溶解し、60℃に保温したピリジン中に攪拌しながら30分間で滴下した。5時間60℃に保ち、その後終夜30℃で攪拌した。減圧下ピリジンを留去し、エーテルを

加えて得た白色粉末をアセトン／エーテルから再結晶して、0.61g (0.57mmol、935)を得た。

(13) GlyArgGlyAspSerProAla の合成

GlyArg(Tos)GlyAsp(OBzl)Ser(Bzl)ProAla

0.6g(0.57mmol)にアニソール1ml、クレゾール1mlを加え、HF 50mlを加えて0℃1時間攪拌したのち、減圧下で留去してエーテルを加え、濾取して白色粉末を得た。これを水100mlに溶解し、凍結乾燥して、0.40gを得た。0.1% TFA水溶液10mlに溶解し、セミ分取ODSカラムを用いたHPLCに供しアセトニトリル10%の画分を集め、凍結乾燥し40mgの目的物を得た。

アミノ酸分析 : Gly 1.96    Arg 0.95    Asp 0.97  
                  Ser 0.82    Pro 0.87    Ala 1.0

(14) 線状ペプチド (GRGDSPA) の合成

(11)で合成した生成物を(13)と同様の方法で脱保護し精製して GlyArgGlyAspSerProAlaを得た。

B. ペプチドマップ

(13)で合成したペプチドをトリプシンで分解し、環状ペプチドであることを確認した。

ペプチドを蒸留水で10mg/mlに溶解し、20

$\mu$ l に Buffer. (Tris-HCl 100mM. pH8.5) 180  $\mu$ l を加え希釈する。これにトリブ溶液 (1mg/ml 5 M HCl. CaCl<sub>2</sub> 10mM) 5  $\mu$ l を加え 37℃ に 24 時間保温した。2 N HCl を 10  $\mu$ l 添加し、反応を終了させた。そのうち 50  $\mu$ l を高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) に供し分析を行った。

分析条件 HP

HPLC: ウォーターズ モデル 510

カラム: YMC-ODS

検出: A<sub>214</sub>

溶出: A 液 0.1% TFA 水溶液

B 液 0.1% TFA アセトニトリル溶液

0% B → 30% B 直線濃度勾配

(0 分) (30 分)

第 1 図は実施例で合成した環状ペプチドの分析結果を示すグラフである。また、(14)で合成した線状ペプチド (GRGDSPA) を上記と同一条件で試験した。その分析結果を第 2 図に示す。

第 1 図および第 2 図の結果が示すように、実施例 1 (13) で得られたペプチドは環状であり、かつ線状ペプチドと比較してトリブシン処理により開環するがそれ以上に分解を受けにくいことが確認された。



## 実施例 2

A. 環状ペプチド ( R G D S P A A V T G )  
の合成

実施例 1 と同様に環状ペプチドを合成した。

以下に、その合成法の概略を示す。

(1) Boc Thr(Bzl)GlyoBzl の合成

Boc Thr(Bzl)	6.18g	20mmol	
GlyoBzl·TosOH	6.74g	20mmol	DMF 40ml
WSC·HCl	3.84g		pH 7
HOBt	3.06g		N-メチルモルホリン

↓

BocThr(Bzl)GlyoBzl  
7.32g(16mmol) 80%

(2) Boc ValThr(Bzl)GlyoBzl の合成

上記 (1) の生成物 6.0g (13mmol)

T F A	30ml	
Boc Val	2.8g(13mmol)	
WSC·HCl	2.5g	
HOBt	2.0g	DMF 30ml
		pH 6
		N-メチルモルホリン

↓

BocValThr(Bzl)GlyoBzl  
6.75g(12.2mmol 94%)

(3) Boc Ala Thr (Bzl) GlyoBzl の合成

上記 (2) の生成物 3.4g (6.1mmol)

T F A 20ml

Boc Ala 1.2g (6.3mmol)

WSC·HCl 1.2g

HOBt 0.94g DMF 15ml  
pH 6

↓

N-メチルモルホリン

BocAlaValThr (Bzl) GlyoBzl

3.18g (5.1mmol 83.6%)

(4) BocAlaValThr (Bzl) GlyOH の合成

上記 (3) の生成物 2.8g (4.5mmol) をメタノール 20ml に懸濁し、氷浴中にして、1 N NaOH 水溶液 9 ml を滴下した。3 時間攪拌したのち、1 N HCl 12ml を加えて、減圧下でメタノールを留去したところ白色結晶が析出した。結晶を濾過しよく水洗したのち乾燥した。2.2g (4.2mmol 93%)

(5) BocAlaValThr (Bzl) GlyArg (Tos) GlyoBzl の合成

上記 (4) の生成物 2.1g (4mmol)

H<sub>2</sub>NArgGlyoBzl·TFA 2.3g (4mmol)

WSC·HCl 0.6g

HOBt 0.8g DMF 15ml  
pH 6

↓

N-メチルモルホリン

- 25 -

MeOH/ether より再結晶

3.39g (3.5mmol 87%)

(6) BocAlaValThr(Bzl)GlyArg(Tos)GlyOHの合成

上記(5)の生成物 3.2g (3.3mmol)

メタノール 20ml

アセトン 10ml

1N NaOH 5ml 氷浴中にて、3時間攪拌

↓ ← 1N HCl 5ml

減圧濃縮、濾過、水洗、乾燥

↓

2.81g (3.2mmol, 97%)

(7) BocAlaValThr(Bzl)GlyArg(Tos)GlyAsp(OBzl)  
Sen(Bzl)ProAlaOPacの合成

上記(6)の生成物 1.8 g (2mmol)

H<sub>2</sub>NAsp(OBzl)Sen(Bzl)

ProAlaOPac·TFA 1.5 g (2mmol)

[前記実施例1 (9)の生成物]

HOBt 0.3 g

WSC·HCl 0.5 g

DMF 10 ml pH6 N-メチルモルホリン

↓

反応後水を加えて白色粉末

↓

水, 1N HCl, 水, 5% NaHCO<sub>3</sub>, 水でよく洗淨

↓

乾燥 2.8 g (1.8 mmol 90%)

(8) BocAlaValThr(Bzl)GlyArg(Tos)GlyAsp(OBzl)  
Sen(Bzl)ProAlaOHの合成

上記(7)の生成物 1.8 g (1.16 mmol)

90% 酢酸 40ml, 亜鉛末 4.5 g

↓

氷浴中で2時間攪拌

↓

濾過して、亜鉛末を除去した後、  
減圧下で酢酸を除去したのち1N  
HClを加えて、白色沈殿を得た。

↓

濾過してよく水洗した。

1.63 g (1.12 mmol, 96%)

(9) AlaValThr(Bzl)GlyArg(Tos)GlyAsp(OBzl)-  
-Sen(Bzl)ProAlaの合成

上記(8)の生成物 1.5 g (1.03 mmol)

HOSu 0.12 g

WSC·HCl 0.3 g

DMF 5ml pH6 N-メチルモルホリン

↓

1.47 g

↓ ← TFA 20ml

減圧濃縮

↓

DMF 30mlに溶解後、55℃に保温した1  
1ピリジンに攪拌しながら滴下した。  
55℃で5時間、室温で終夜反応させた  
のち、減圧下でピリジンを留去した。  
水を加えて、白色沈殿を析出させ、濾  
過してよく水洗したのち、乾燥した。  
1.61 g (0.98mmol 95 %)

(10) AlaValThrGlyArgGlyAspSenProAla

の合成・精製

上記(9)の生成物	1.61 g (0.98mmol)
HF	100 ml
アニソール	5 ml
クレゾール	5 ml

↓

0℃1時間、減圧下にHFを留去したの  
ち、エーテルを加えて、白色沈殿を得  
た。濾過したのち、水に溶解し凍結乾  
燥した。凍結乾燥粉末 1.01 g

精製は、実施例1 (13) と同じ条件で行った。

## B. ペプチドマップ

実施例 1、B と同じ条件で環状ペプチドの分解試験を行った。分析条件は下記の通りである。

## 分析条件

H P L C : シマズ LC-6A

カラム : YMC ODS

検 出 : A 214

溶 出 : A 液 0.1% TFA 水溶液

B 液 0.1% TFA アセトニトリル溶液

5%B → 80%B 曲線濃度勾配  
(0分) (30分) (B curve 3)

結果を第 5 図に示す。また、対応する線状ペプチド (AVTGRGDSPA) を合成し、同じ試験をおこなった結果を第 6 図に示す。

## 実施例 3

A. 環状ペプチド ( R G D N P A G ) の合成

## (1) BocAsnOPFP の合成

BocAsn 23.2g (100mmol) を DMF 200ml に溶解し氷冷下ペンタフルオロフェノール 22.1g (120mmol) , DCC 24.7g (120mmol) を加えて、30 分間攪拌した。さらに常温で 1 時間攪拌したのち、減圧下で DMF を留去した。残渣を酢酸エチルに

溶解し濾過して DC ureaを除いたのち、水洗し、無水硫酸ナトリウムを加えて乾燥した。減圧下で濃縮したのち、エーテルを加えて結晶化した。16.26g (収率 40.8 %)。

(2) BocAsnProAlaOBzlの合成

BocProAlaOBzl 3.76g (10mmol) に TFA 20ml を加えて室温で20分間反応させたのち減圧下で TFA を留去したのち、エーテルを加えて得た白色沈殿を濾取し、乾燥した。これを DMF 20ml に溶解し氷冷下 HOBt 1.5gを加え、N-メチルモルホリンで pH を6に合わせた。そこへ、BocAsnOPFP 4gを加え、再びN-メチルモルホリンで pH を7に合わせ、終夜攪拌した。減圧下で DMFを留去したのち、残渣を酢酸エチルに溶解し、水, 1N HCl, 水, 5% NaHCO<sub>3</sub>, 水の順に洗浄し、無水硫酸ナトリウムを加えて乾燥した。減圧下で酢酸エチルを留去したのち、エーテル-ヘキサンから結晶化させ、目的物 3.3g (67.3 %) を得た。

アミノ酸分析: Asx 1.01 Ala 1.03 Pro 0.95

(3) BocAsp(OcHex)AsnProAlaOBzlの合成

BocAsnProAlaOBzl 3g (6.1mmol) に TFA 20ml を加え、室温で20分間攪拌したのち、減圧下で

TFA を留去した。エーテルを加えて得られた白色沈殿を濾取し乾燥したのち、DMF 15mlに溶解した。氷冷下 N-メチルモルホリンで pH を 6 に合わせ、そこへ BocAsp(OcHex)OSu 4.12g (10mmol)を加え、再び N-メチルモルホリンで pH を 7 に合わせて、終夜攪拌した。減圧下で DMF を留去したのち、残渣を酢酸エチルに溶解し、1,3-ブパンジアミンを加えて、室温で 1 時間攪拌した。酢酸エチル層を水, 1 N HCl, 水, 5% NaHCO<sub>3</sub>, 水の順に洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下で濃縮し、酢酸エチル-ヘキサンから結晶化して、目的物 3.63g (87%) を得た。

アミノ酸分析: Asx 1.98 Ala 0.98 Pro 1.02

(4) BocGlyArg(Tos)GlyAsp(OcHex)AsnProAlaOBzl  
の合成

BocAsp(OcHex)AsnProProAlaOBzl 3.43g (5mmol)に TFA 20mlを加えて室温で 20 分間攪拌した。減圧下で TFA を留去したのち、エーテルを加えて得た白色沈殿を濾取し、乾燥した。ここに DMF 20mlを加え溶解させたのち、氷冷下 BocGlyArg(Tos)GlyOH 3g (4.9mmol), HOBt 0.92g, WSC·HCl 1.2gを加えた。N-メチルモルホリンで



pHを6に合わせて終夜攪拌した。減圧下 DMFを留去したのち、残渣を酢酸エチルに溶解し、水、1 N HCl、水、5% NaHCO<sub>3</sub>、水の順に洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去して目的物の白色粉末 4.4g (収率75%)を得た。

アミノ酸分析    Asx 1.84    Gly 2.17    Ala 0.96  
                  Arg 1.04    Pro 0.97

(5) BocGlyArg(Tos)GlyAsp(OcHex)AsnProAlaOH

の合成

BocGlyArg(Tos)GlyAsp(OcHex)AsnProAlaOBzl  
4.4g (75%) をメタノール 50ml、水 0.5ml、  
酢酸 0.5mlに溶解し、5% Pd-C 1gを加えて、水  
素を5時間通気した。濾過したのち、濾液を減  
圧下で留去し、残渣にエーテルを加えて固化さ  
せ、濾取し乾燥した。4.5g (4.1mmol)

(6) GlyArg(Tos)GlyAsp(OcHex)AsnProAla

の合成

BocGlyArg(Tos)GlyAsp(OcHex)AsnProAlaOH  
3g (2.7mmol)をDMF 10mlに溶解し、氷冷下HOSu  
0.6g、WSC·HCl 1gを加え終夜攪拌した。減圧下  
でDMFを留去したのち、残渣に水を加えて固化  
させ、よく水洗して濾取した。減圧下で乾燥し

たのち、TFA 15mlを加えて、室温で15分間攪拌した。減圧下でTFAを留去したのち、エーテルを加えて固化させ濾取し、乾燥した。これをDMF 30mlに溶解し、53℃に加熱したピリジン1.51に30分間で滴下し、53℃で9時間、室温で終夜攪拌した。ピリジンを減圧下で留去したのち、よく水洗して乾燥し、目的物 1.05g (63%)を得た。

アミノ酸分析    Asx 2.09    Gly 2.6    Ala 1.06  
                  Arg 1.21    Pro 0.98

(7) GlyArgGlyAspAsnProAla の合成

GlyArg(Tos)GlyAsp(OxHex)AsnProAla

1.03g にアニソール 5ml ,トリクレゾール 2mlを加えたのち HF 60mlを加えて0℃で1時間反応させた。減圧下で HF を留去したのち、エーテルを加えて固化させ、その沈殿をエーテルでよく洗浄した。これを10%酢酸に溶解させたのち、凍結乾燥し、粗ペプチド 0.98gを得た。実施例 1 (13) と同じ条件で精製を行い、精製物 130mg を得た。

(8) GlyArgGlyAspAsnProAla の合成

(比較ペプチドの合成)

BocGlyArg(Tos)GlyAsp(OcHex)AsnProAlaOBzl  
1.3gにアニソール 2ml, クレゾール 2mlを加えたのち、HF 60mlを加えて、0℃で1時間反応させた。減圧下でHFを除いたのち、エーテルを加えて固化させ、エーテルでよく洗浄した。この白色粉末を10%酢酸に溶解させたのち、凍結乾燥し粗ペプチド0.99gを得た。これを実施例1 (13)と同様に精製し、精製物 64mgを得た。

#### 実施例 4

A. 環状ペプチド (  $\boxed{\text{R G D S P A V T G}}$  )  
の合成

##### (1) BocValThr(Bzl)GlyArg(Tos)GlyOHの合成

BocValThr(Bzl)GlyArg(Tos)GlyOBzl 2.9g  
(2.86mmol) を 5mlメタノールに溶解し、1N NaOH 4.3mlを滴下して、1時間攪拌した。1N HCl 5mlを加えて減圧濃縮し、酢酸エチル 50mlで抽出した。酢酸エチル層を水 50mlで2回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥したのち、減圧で溶媒を留去し白色粉末 2.3g (2.8mmol)を得た。

##### (2) BocValThr(Bzl)GlyArg(Tos)GlyAsp(OBzl) Ser(Bzl)ProAlaOPacの合成

BocValThr(Bzl)GlyArg(Tos)GlyOH

1.63g (2mmol)

H<sub>2</sub>NAsp(OBzl)Ser(Bzl)ProAlaOPac

1.5g (1.9mmol)

DMF 10ml に溶解

↓

HOBt 0.3g , WSC·HCl 0.5g を加えて終夜攪拌

↓

減圧で溶媒を留去したのち、水を加えて固  
化、濾過したのち、水、1N HCl、水、5%  
NaHCO<sub>3</sub>、水の順に洗浄、真空で乾燥して、2.66  
g (1.79mmol, 94%) を得た。

アミノ酸分析    Asp 0.98    Thr 0.70    Ser 0.82  
                 Gly 1.81    Ala 1.        Val 0.85  
                 Arg 0.71    Pro 0.91

(3) BocValThr(Bzl)GlyArg(Tos)GlyAsp(OBzl)  
Ser(Bzl)ProAlaOHの合成

BocValThr(Bzl)GlyArg(Tos)GlyAsp(OBzl)Ser  
(Bzl)ProAlaOPac 1.8g (1.2mmol)を90%酢酸に  
溶解し亜鉛末 4.5g を加え1時間攪拌した。濾  
過したのち、濾液を減圧で 固した。1N HCl  
を加えたのち、クロロホルムで抽出し、有機相  
を水で洗浄した。減圧濃縮したのち、エーテル  
を加えて-20℃に保温した。析出した白色粉末

を濾取し乾燥して 1.59g (1.15mmol, 96%) を得た。

(4) ValThr(Bzl)GlyArg(Tos)GlyAsp(OBzl)

Ser(Bzl)ProAla の合成

BocValThr(Bzl)GlyArg(Tos)GlyAsp(OBzl)Ser(Bzl)ProAlaOH 1.4g (1mmol)を DMF 5ml に溶解した。氷冷下 HOSu 0.15g, WSC·HCl 0.25gを加え、N-メチルモルホリンを加えて pH6 にして終夜攪拌。水を加えて生じた白色粉末を酢酸エチルで抽出し減圧濃縮した。エーテルを加えて白色粉末を得た。これを水洗し、乾燥したのち、TFA 20mlを加えて室温で20分間攪拌、減圧下でTFAを除いたのち、DMF 20mlを加え溶解し、これを55℃に保温したピリジン11中に滴下した。55℃で5時間、30℃で終夜反応させたのち、減圧濃縮した。残渣にエーテルを加え生じた白色粉末を濾取、乾燥して、1.12g (89%) を得た。

(5) ValThrGlyArgGlyAspSerProAla

の合成、精製

(4) の生成物 1.12gを用い、実施例 1 (13)と同様の方法で HF で脱保護し、粗生成物 0.74

g を得、さらに実施例 1 (13) と同じ条件で精製を行ない、精製環状ペプチド 185mg を得た。

アミノ酸分析 : Asp 1.04 , Thr 0.88 , Ser 0.89  
Gly 2 , Ala 1.0 , Val 0.97  
Arg 1.0 , Pro 0.93

(6) 線状ペプチド (ValThrGlyArgGlyAspSerProAla)  
の合成

上記 (1) ~ (3) と同様にして (3) の生成物を合成し、その 1.1g を実施例 1 (13) と同様の方法で HF で脱保護し、粗生成物 0.7g を得、さらに同様に精製して線状ペプチド 140mg を得た。

アミノ酸分析 : Asp 1.0 , Thr 0.80 , Ser 0.80  
Gly 2 , Ala 1.05 , Val 0.96  
Arg 0.93 , Pro 1.13

実施例 5

A. 細胞接着阻害活性の測定

(1) 合成した環状ペプチドが細胞のフィブロネクチンやビトロネクチンに対する接着を阻害する活性を測定した。

フィブロネクチンあるいはビトロネクチンを PBS- ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.005M + NaCl 0.075M) で各々 1.0  $\mu\text{l}$  / ml、2.0  $\mu\text{l}$  / ml に希釈し、その希釈液 0.5ml を 24well のプラスチックプレートに

入れ、37℃で4時間保温して、コーティングした。次にプラスチックに対する非特異的接着を防ぐ為、1% BSA（牛血清アルブミン）を加え、37℃で1時間保温した。そののち、PBS-で洗浄し、充分に水切りしたのち、D-MEM 培地（GIBCO社製）で希釈したペプチド溶液を0.25ml 加え、そこへ  $4 \times 10^5$  cells/ml のヒト扁平上皮ガン A431 細胞懸濁を0.25ml 加え、37℃で1時間保温し、細胞を接着させた。D-MEM 培地で3回洗浄し、未接着の細胞を除いたのち、0.025% + 0.025% EDTA トリプシン溶液で接着した細胞をはがし、トリパンブルーで染色して細胞数を計測した。結果を下記第1表に示す。

第1表

フィブロネクチンに対する接着阻害  
(cells/well)

ペプチド ／濃度	0	0.25	0.5	1.0	1.5mg/ml
RGD	152	—	162	—	83
GRGDSPA	152	—	175	126	111
GRGDSPA	152	57	26	22	13

ビトロネクチンに対する接着阻害  
(cells/well)

ペプチド ／濃度	0	10	50	100	300	500mg/ml
RGD	248	—	133	104	73	—
GRGDSPA	248	158	115	86	68	60
□GRGDSPA□	248	58	45	49	33	50

上記結果を接着阻害パーセントで表わしたグラフを第3図と第4図に示す。第4図はフィブロネクチンコートの場合、第5図はビトロネクチンコートの試験結果を表わしたものである。

(2) 上記と同じ阻害活性試験（ただし、フィブロネクチンのみ使用）を実施例2で合成した環状ペプチドに対して行った。その結果を下記第2表と第7図に示す。

第2表

接着細胞数 (cells/well)

ペプチド濃度	0	0.25	0.5	1.0	1.5 mg/ml
GRGDSP	375	—	227	—	198
AVTGRGDSPA	375	204	188	169	193
□AVTGRGDSPA□	375	163	168	162	141

## B. 血小板凝集阻害活性試験

被検薬の *in vitro* 血小板凝集阻害作用をヒト富血小板血漿を用いて検定した。採血したヒ



ト血液に 1 / 9 量の 3.8% クエン酸ナトリウムを加え遠心 (1000 rpm .10 分間) し、上層を富血小板血漿 (PRP) として分取した。PRP 200  $\mu$ l に被検薬 25  $\mu$ l を加え、3 分間 37℃ でインキュベートしたのち、20~50  $\mu$ M ADP 溶液あるいは 50~200  $\mu$ g/ml のコラーゲン溶液あるいはトロンビン溶液を 25  $\mu$ l 加えて、凝集の様子をアグリゴメーターで透過度を測定した。

$$\text{凝集阻害率} = (1 - T / T_0) \times 100 \%$$

$T_0$  : 被検薬非添加時の透過度

$T$  : 被検薬添加時の透過度

表 血小板凝集阻害

	I C <sub>50</sub> ( $\mu$ g / ml )		
	ADP 刺激 の場合	コラーゲン 刺激の場合	トロンビン 刺激の場合
GRGDSPA	150	200	1000
<span style="border: 1px solid black;">GRGDSPA</span>	2.0	3.5	7.0
<span style="border: 1px solid black;">VTGRGDSPA</span>	15	25	—
<span style="border: 1px solid black;">AVTGRGDSPA</span>	80	100	—
<span style="border: 1px solid black;">GRGDNPA</span>	2.5	6.6	—

### C. がん転移阻害活性試験

マウスにおける B16メラノーマ細胞の肺への

転移に対する GRGDSPA の効果を調べた。1

群 6～10匹の C57BLマウスの尾静脈に B 16メラノーマ細胞  $2 \times 10^5$  個を注入し、3週間後に肺を摘出し、転移結節数を測定した。被検ペプチドは、細胞注入時に同時に投与した。

結果を下表に示す。

	投与量	肺転移阻害率
GRGDSPA	1 mg	42 %
<u>GRGDSPA</u>	0.1 mg	94 %

D. 手術時の血小板凝集に対する GRGDSPA の効果

人工心肺を用いた外科的手術の際、血小板の凝集が誘起され、血小板数が減少することが知られている。

GRGDSPA がこの凝集を低濃度で阻害することが示され手術時の血小板凝集抑制剤として使用できることが証明された。下表に手術や GRGDSPA を  $100 \mu\text{g}$  (体重  $1 \text{ kg}$  1 分間当り) 添加した際の血小板の減少を調べた結果を示す。コントロールとしてペプチドのかわりに P B S を加えたものを用いた。

	血 小 板	
手術の時間	ペプチド添加なし	<span style="border: 1px solid black;">GRGDSPA</span> 添加
手術前	100%	100%
10分後	75%	90%
60分後	60%	95%

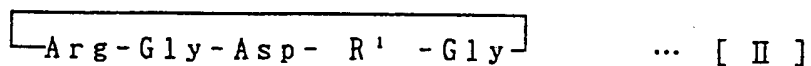
## 請求の範囲

1. 下記式 [ I ] で表わされる合成環状ペプチド、またはその塩、からなるペプチド誘導体。



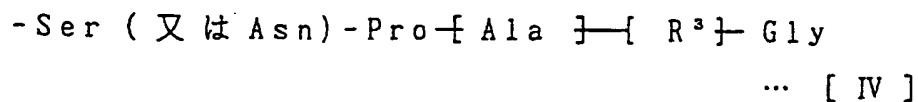
ただし、R は、アミノ酸残基あるいはオリゴ～ポリペプチド残基

2. R がアミノ酸残基数 16 以下のオリゴ～ポリペプチド残基である、請求項 1 記載のペプチド誘導体。
3. 合成環状ペプチドが下記式 [ II ] で表わされるものである、請求項 1 記載のペプチド誘導体。



ただし、R<sup>1</sup> はアミノ酸残基あるいはオリゴ～ポリペプチド残基。

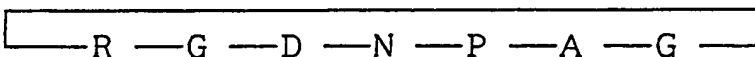
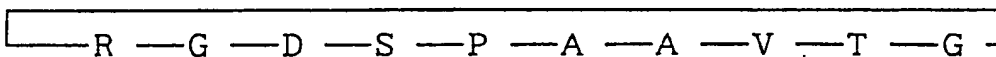
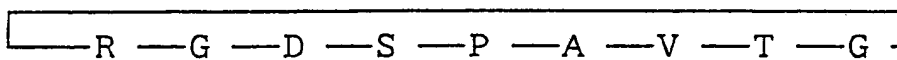
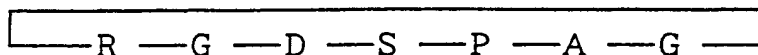
4. R が下記 [ IV ] で表わされるオリゴペプチド残基である請求項 1 記載のペプチド誘導体。



ただし、[ ] は存在するかあるいは存在し

ない残基を示し、 $R^3$ が存在する場合、 $R^3$ はアミノ酸残基あるいはアミノ酸残基数 7 以下のオリゴペプチド残基を示す。

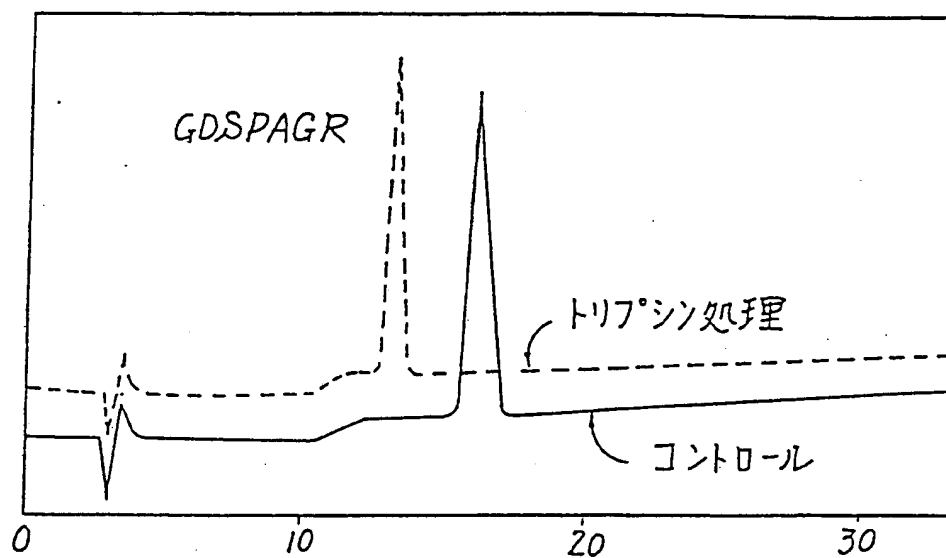
5. 下記いずれかの式で表わされる合成環状ペプチド（ただし、アミノ酸残基は一文字表示で表わした）。



6. 請求項 1 ないし請求項 5 のいずれか記載のペプチド誘導体を有効成分とする動物細胞の接着を阻害する薬剤。
7. 動物細胞が哺乳動物の体細胞である、請求項 6 記載の薬剤。
8. 動物細胞が癌細胞である、請求項 6 記載の薬剤。
9. 請求項 1 ないし請求項 5 のいずれか記載のペプチド誘導体を有効成分とする血小板凝集を阻害する薬剤。

第 1 図 ✓

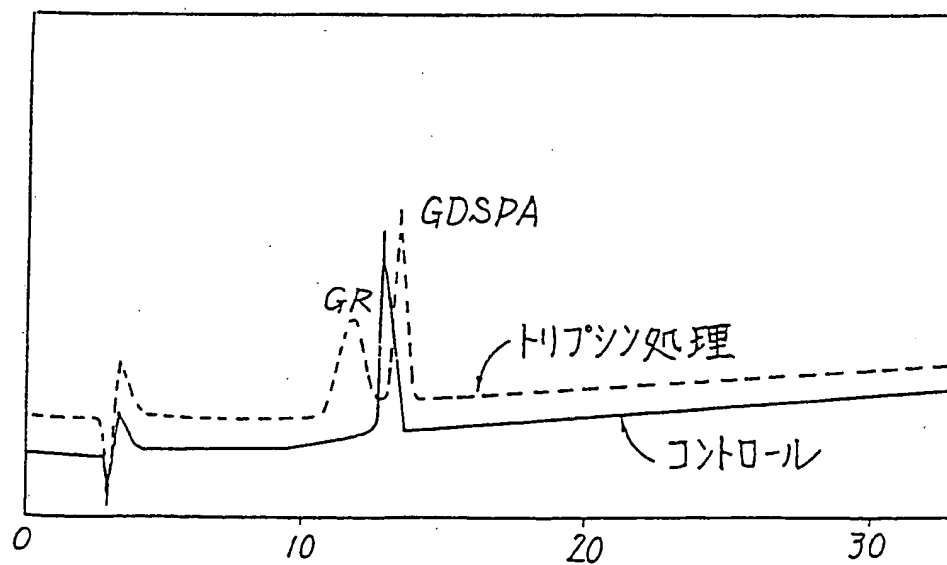
[GRGDSPA]



時間 (分)

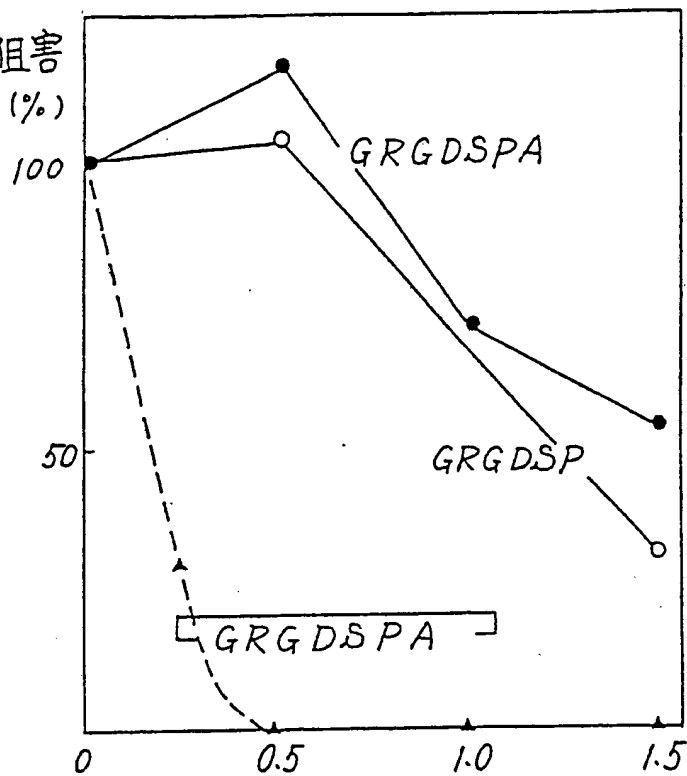
第 2 図

GRGDSPA



時間 (分)

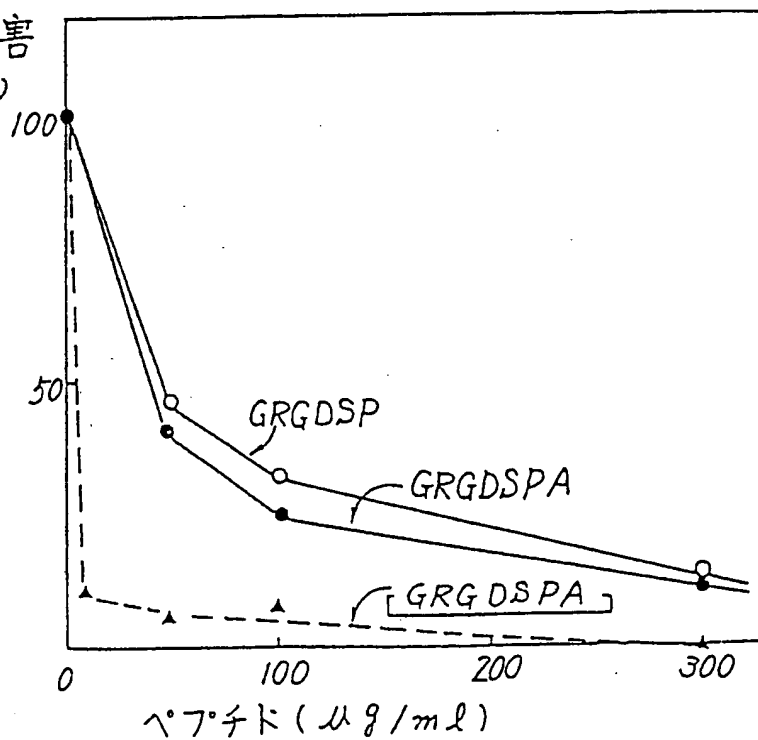
第3図 接着阻害 (%)



ペプチド (mg/ml)

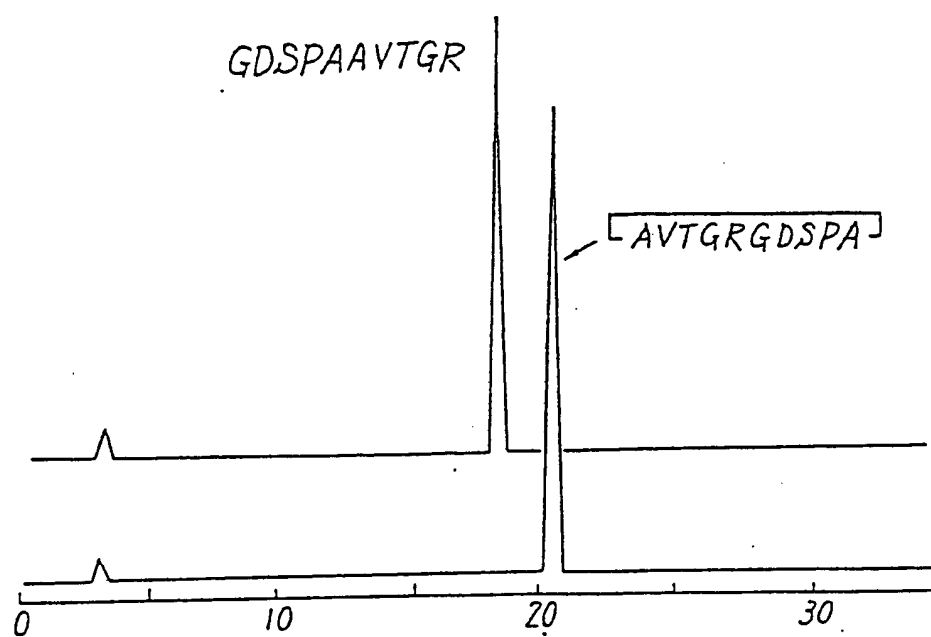
第4図

接着阻害 (%)

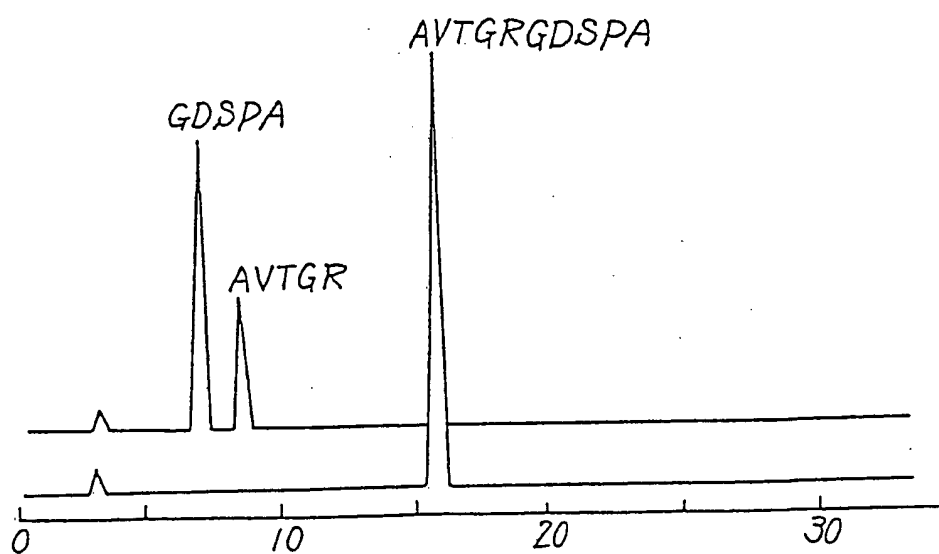


ペプチド (μg/ml)

## 第 5 図

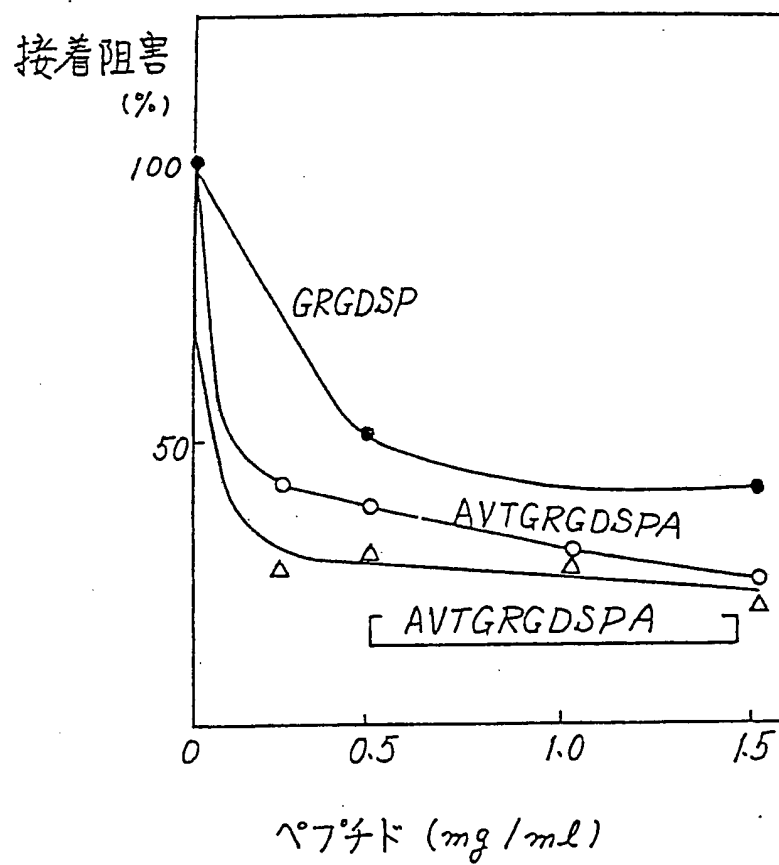


## 第 6 図





## 第 7 図



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP89/00926

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (If several classification symbols apply, indicate all) <sup>4</sup> According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC  <div style="display: flex; justify-content: space-between; padding: 0 10px;"> <span>Int. Cl<sup>4</sup></span> <span>C07K5/12, C07K7/64, A61K37/02, C12N5/00</span> </div>								
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>  <div style="text-align: center; padding: 5px;">Minimum Documentation Searched :</div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; padding: 0 10px;"> <span>Classification System :</span> <span>Classification Symbols</span> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; padding: 0 10px; margin-top: 10px;"> <span>IPC</span> <span>C07K5/00, C07K7/00, A61K37/02, C12N5/00</span> </div> <div style="text-align: center; padding: 5px; margin-top: 10px;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup></div>								
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>1</sup></b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 5px;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Category <sup>9</sup></th> <th style="width: 70%;">Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup></th> <th style="width: 20%;">Relevant to Claim No. <sup>13</sup></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="vertical-align: top; padding: 5px;">WO, A, 88/03560 (Max - Planck - Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften E.V.) 19 May 1988 (19. 05. 88) Page 3 &amp; DE, A, 3637260 &amp; EP, A, 331672</td> <td style="vertical-align: top; padding: 5px;">1 - 9</td> </tr> </tbody> </table>			Category <sup>9</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>	A	WO, A, 88/03560 (Max - Planck - Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften E.V.) 19 May 1988 (19. 05. 88) Page 3 & DE, A, 3637260 & EP, A, 331672	1 - 9
Category <sup>9</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>						
A	WO, A, 88/03560 (Max - Planck - Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften E.V.) 19 May 1988 (19. 05. 88) Page 3 & DE, A, 3637260 & EP, A, 331672	1 - 9						
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p><sup>10</sup> Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div>								
<b>IV. CERTIFICATION</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 5px;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;">           Date of the Actual Completion of the International Search             November 20, 1989 (20. 11. 89)         </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;">           Date of Mailing of this International Search Report             December 4, 1989 (04. 12. 89)         </td> </tr> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;">           International Searching Authority             Japanese Patent Office         </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;">           Signature of Authorized Officer         </td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search  November 20, 1989 (20. 11. 89)	Date of Mailing of this International Search Report  December 4, 1989 (04. 12. 89)	International Searching Authority  Japanese Patent Office	Signature of Authorized Officer		
Date of the Actual Completion of the International Search  November 20, 1989 (20. 11. 89)	Date of Mailing of this International Search Report  December 4, 1989 (04. 12. 89)							
International Searching Authority  Japanese Patent Office	Signature of Authorized Officer							

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC)      Int. C <sup>4</sup> C 07 K 5 / 1 2 ,   C 07 K 7 / 6 4 ,   A 61 K 3 7 / 0 2 , C 1 2 N 5 / 0 0		
II. 国際調査を行った分野		
調 査 を 行 っ た 最 小 限 資 料		
分 類 体 系	分 類 記 号	
IPC	C 07 K 5 / 0 0 ,   C 07 K 7 / 0 0 ,   A 61 K 3 7 / 0 2 , C 1 2 N 5 / 0 0	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー	引用文献名   及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
A	WO , A , 8 8 / 0 3 5 6 0 (Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften E. V. ) , 19. 5月. 1988 ( 19. 05. 88 ) 第 3 頁 & DE , A , 3 6 3 7 2 6 0 & EP , A , 3 3 1 6 7 2	1 - 9
※ 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の 日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出 願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解 のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新 規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の 文献との、当業者にとって自明である組合せによって進 歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリーの文献		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
20. 11. 89	04. 12. 89	
国際調査機関	権限のある職員	4 H 8 3 1 8
日本国特許庁 (ISA/JP)	特許庁審査官	前 田 憲 彦 ©